

⑤

Int. Cl. 2:

C 07 G 7/02

⑱ **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

A 61 K 37/54



DE 28 15 853 A 1

⑪

Offenlegungsschrift 28 15 853

⑫

Aktenzeichen:

P 28 15 853.4

⑫

Anmeldetag:

12. 4. 78

⑬

Offenlegungstag:

19. 10. 78

⑳

Unionspriorität:

⑳ ㉑ ㉒

12. 4. 77 Frankreich 7711004

⑤④

Bezeichnung:

Gereinigte Urokinasepräparate und Verfahren zu ihrer Herstellung

⑦①

Anmelder:

Choay S.A., Paris

⑦④

Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys. Dr.;
Weickmann, F.A., Dipl.-Ing.; Huber, B., Dipl.-Chem.; Liska, H., Dr.-Ing.;
Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦②

Erfinder:

Lormeau, Jean-Claude, Maromme-la-Maine; Choay, Jean, Paris;
Goulay, Jean, Oissel (Frankreich)

DE 28 15 853 A 1

PATENTANSPRÜCHE

① Verfahren zur Abtrennung von Urokinase mit einem Molekulargewicht von etwa 54.000 (Urokinase II) von einer Fraktion, die Urokinase mit einem Molekulargewicht von etwa 33.000 enthält (Urokinase I), dadurch gekennzeichnet,

daß man die zu trennende Urokinasemischung mit einem Ionenaustauscherharz, das die Urokinasen zu binden vermag, in Kontakt bringt, wobei man die Urokinasemischung in einer Pufferlösung auf der Grundlage eines Mineralsalzes einsetzt, das bei einer gegebenen Konzentration die Rückhaltung oder die Bindung der beiden Urokinasearten durch das bzw. an das Harz ermöglicht, wenn dieses mit einer solchen gepufferten Lösung äquilibriert wird;

daß man anschließend das Harz wäscht, insbesondere mit der gleichen Pufferlösung, bis der Abstrom keine Proteine mehr enthält; und

daß man über das Harz, an das die Urokinasen gebunden sind, eine ähnliche Pufferlösung führt, mit dem Unterschied, daß man ihre Konzentration an dem Mineralsalz beginnend mit einem Anfangswert, wie dem oben definierten, bis zu einem Wert, bei dem keine Urokinaseart mehr von dem Harz zurückgehalten wird, unter geeigneten Entwicklungsbedingungen variiert, daß eine aufeinanderfolgende aber getrennte Elution der beiden Urokinasearten erfolgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Urokinase II enthaltende Fraktion gewinnt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Harz auf der Grundlage einer

Agarose, deren Ketten miteinander vernetzt sind, vorzugsweise ein Carboxymethylgruppen aufweisendes Harz, wie das unter der Bezeichnung "Carboxymethyl-Sepharose[®]" bekannte verwendet.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die eingesetzte Urokinasemischung eine spezifische Urokinaseaktivität von mindestens 5.000 CTA-Einheiten/mg Proteine, vorzugsweise von 8.000 oder mehr CTA-Einheiten/mg Proteine aufweist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die gepufferte Lösung einen pH-Wert zwischen etwa 4 und etwa 7, vorzugsweise einen pH-Wert von etwa 6, aufweist und man als Mineralsalz, dessen Konzentration variiert wird, Ammoniumsulfat verwendet, dessen Anfangskonzentration, die die Bindung der Urokinasen an dem Harz ermöglicht, zwischen etwa 0,01 Mol/l und 0,06 Mol/l und insbesondere im Bereich von 0,04 Mol/l bis 0,06 Mol/l, noch bevorzugter bei etwa 0,04 Mol/l, und dessen Endkonzentration, bei dem die an das Harz gebundenen Urokinasen eluiert werden, zwischen etwa 0,1 und 0,5 Mol/l und vorzugsweise bei etwa 0,25 Mol/l liegen.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man pro 0,1 bis 1.000.000 CTA-Einheiten Urokinase 1 ml des Ionenaustauscherharzes oder Ionenaustauschergels verwendet.

7. Pharmazeutische Zubereitung auf der Grundlage von Urokinase, die insbesondere durch Injektion, Perfusion oder in analoger Weise verabreicht werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Urokinase Urokinase II enthält, die weniger als 1 Gewichtsprozent Urokinase I enthält.

8. Zubereitung nach Anspruch 7, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t , daß sie von Urokinase I freie Urokinase II
enthält.

5 9. Zubereitung nach Anspruch 7, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t , daß die Reinheit der in der Zubereitung
enthaltenen Urokinase II so groß ist, daß man nur eine Bande
mit Urokinaseaktivität feststellt, wenn man sie in einer 0,04m
Ammoniumsulfatlösung mit einem pH-Wert von 6 löst, diese Lö-
10 sung in einer Chromatographiesäule mit einer ausreichenden
Menge eines Harzes des Typs einer Carboxymethyl-Sepharose in
Kontakt bringt und die Säule unter Anwendung eines linearen
Graduents eluiert, bis man ein Eluat mit einem pH-Wert von
6 und einem Ammoniumsulfatgehalt von 0,25 Mol/l erhält.

15 10. Zubereitung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch g e -
k e n n z e i c h n e t , daß die enthaltene Urokinase II
eine spezifische Aktivität von mindestens 100.000 CTA-Ein-
heiten/mg Proteine sowohl in bezug auf Fibrinplättchen als
auf Fibringerinnsel als auch auf das synthetische Substrat
AGLME ausübt.

20 11. Zubereitung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch
g e k e n n z e i c h n e t , daß sie die Glutanyl-plasmino-
gen-spaltung nur an einer Stelle bewirkt.

25 12. Zubereitung nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch
g e k e n n z e i c h n e t , daß sie eine äquivalente Akti-
vität in bezug auf Glutanyl-plasminogen und auf modifizierte
Plasminogene ausübt.

PATENTANWÄLTE

2815853
DIPL.-ING. H. WEICKMANN, DIPL.-PHYS. DR. K. FINCKE
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN, DIPL.-CHEM. B. HUBER
Dr. Ing. H. Liska

4

8 MÜNCHEN 86, DEN 12. April 1978
POSTFACH 860820
MÜHLSTRASSE 22, RUFNUMMER 983921/22
HtM/cb
Case: PL-0231 78 B

CHOAY S.A.
48, Avenue Théophile-Gautier
75782 Paris Cedex 16, Frankreich

Gereinigte Urokinasepräparate und Verfahren zur ihrer Herstellung.

809842/1006

- 45 -

Die Erfindung betrifft pharmazeutische Zubereitungen auf der Grundlage von Urokinase, die aufgrund der Art der in diesen Zubereitungen enthaltenen Urokinase unter günstigeren Bedingungen eingesetzt werden können als die bislang zur Verfügung stehenden Präparate, sowie ein Verfahren zur Herstellung einer solchen Urokinase.

Es ist bereits bekannt, daß die handelsüblichen Urokinasen häufig aus Mischungen aus insbesondere zwei Urokinasearten bestehen, die sich im wesentlichen durch ihr Molekulargewicht unterscheiden, das im einen Fall etwa 33.000 und im anderen Fall etwa 54.000 beträgt. Diese beiden Urokinasearten, die im folgenden als "Urokinase I" bzw. "Urokinase II" bezeichnet werden, wurden bislang kaum Untersuchungen unterworfen, die zu der Feststellung geführt hätten, daß sie verschiedene Eigenschaften aufweisen könnten. Bislang stand auch kein Verfahren zur Verfügung, das ihre Trennung in großem Maßstab ermöglicht hätte und das gleichzeitig ausreichend einfach und ausreichend selektiv wäre. In der Tat erfüllt ein Verfahren, das lediglich auf dem Unterschied ihrer Molekulargewichte beruht, der im übrigen zu gering ist, diese Anforderungen nicht.

Die vorliegende Erfindung basiert nun auf der Feststellung, daß diese Trennung unter einfachen Bedingungen und mit zufriedenstellenden Ausbeuten mit Hilfe einer Technik erreicht werden kann, bei der ein Gel verwendet wird, das die Eigenschaften eines Ionenaustauschers besitzt.

Die Erfindung geht von der Erkenntnis aus, daß die enzymatische Aktivität der Urokinase II gegenüber nativem Plasminogen, wie es im menschlichen Blut vorkommt, wesentlich größer ist als die der Urokinase I. Dies trifft in noch stärkerem Ausmaß auf die Kinetik der Wirkung der Urokinase II zu, die bezüglich der Lyse von in verschiedenen Humanblutsubstraten

(Gesamtblut, blutplättchenreiches Plasma und an Blutplättchen verarmtes Plasma) gebildeten Gerinnseln wesentlich aktiver ist als die Urokinase I.

5 Die im wesentlichen von Urokinase I freie Urokinase II kann daher für neue therapeutische Behandlungen eingesetzt werden, bei denen die Urokinase in geringeren Dosierungen verabreicht werden kann als es mit Hilfe klassischer therapeutischer Methoden möglich ist. Diese neuen therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten, die ebenso wirksam sind wie die herkömmlichen, können weiterhin eine bessere Verträglichkeit der
10 Patienten gegenüber therapeutischen Mitteln ermöglichen, deren Wirkung zwar bewiesen ist, deren Anwendung im klinischen Bereich jedoch Vorsicht voraussetzt.

15 Insbesondere ermöglicht die Erfindung die Verbreiterung des Sicherheitsbereiches zwischen den Urokinasedosierungen, bei denen sie voll wirksam sind und bei denen sie aufgrund ihrer Wirkung verursachten Blutungsrisiken an Bedeutung zunehmen. Dadurch ergibt sich auch eine Verminderung des Risikos der Einwirkung der Urokinase auf andere Blutgerinnungsfaktoren.

20 Gegenstand der Erfindung sind somit Zubereitungen oder Arzneimittel, die für therapeutische Zwecke verwendet werden können und die insbesondere durch Injektion, Perfusion oder in analoger Weise verabreicht werden können, die Urokinase II enthalten, die weniger als 1 Gew.-% des anderen Urokinasetyps
25 enthalten und von diesem somit im wesentlichen frei sind.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Trennung dieser beiden Urokinasen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die zu trennende Urokinasemischung mit einem Gel, das die Eigenschaften eines Ionenaustauscherharzes aufweist und die
30 Urokinasen zu binden vermag, in Kontakt bringt, wobei man die Urokinasemischung in einer Pufferlösung auf der Grundlage

- 6 -
7

- eines Mineralsalzes einsetzt, das bei einer gegebenen Konzentration die Rückhaltung oder die Bindung der beiden Urokinasen durch das bzw. an das Gel ermöglicht, wenn dieses mit einer solchen gepufferten Lösung äquilibriert oder ins Gleichgewicht gebracht wird; daß man anschließend das Gel wäscht, insbesondere mit der gleichen Pufferlösung, bis der Abstrom keine Proteine mehr enthält; und daß man über das Gel, an das die Urokinasen gebunden sind, eine ähnliche Pufferlösung führt, mit dem Unterschied, daß man deren Konzentration an dem Mineralsalz beginnend mit einem Anfangswert, wie dem oben definierten, bis zu einem Wert, bei dem keine Urokinaseart mehr von dem Gel zurückgehalten wird, unter geeigneten Entwicklungsbedingungen variiert, daß eine aufeinanderfolgende aber getrennte Elution der beiden Urokinasearten erfolgt.
- 15 Mit Vorteil verwendet man als Gel ein Gel auf der Grundlage einer Agarose, deren Ketten miteinander vernetzt sind und setzt vorzugsweise ein Gel dieser Art ein, das Carboxymethylgruppen aufweist. Man erhält besonders vorteilhafte Ergebnisse dann, wenn man ein perlförmiges Gel auf der Grundlage von
- 20 vernetzter Carboxymethyl-agarose einsetzt, das im Handel unter der Bezeichnung "Carboxymethyl-Sepharose®" erhältlich ist. Sämtliche Behandlungsmaßnahmen werden vorzugsweise bei niedriger Temperatur und insbesondere bei einer Temperatur von etwa 4°C durchgeführt.
- 25 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens hält man die gepufferte Lösung bei einem pH-Wert zwischen etwa 4 und etwa 7 und vorzugsweise bei einem pH-Wert von etwa 6 und setzt als Mineralsalz, dessen Konzentration variiert wird, Ammoniumsulfat ein. Die Anfangskonzentration
- 30 des Ammoniumsulfats in der gepufferten Lösung liegt vorzugsweise zwischen 0,01 und 0,06 Mol/l und insbesondere im Bereich von etwa 0,04 Mol/l. Das Auflösen einer Mischung von Urokinase I und Urokinase II in einer solchen gepufferten

Lösung und das Inkontaktbringen dieser Lösung mit einem Ionenaustauschergel, insbesondere des Typs "Carboxymethyl-Sepharose", das man zuvor mit einer ähnlichen gepufferten Lösung äquilibriert hat, ermöglicht die Bindung der Gesamtheit der anfänglich in der Mischung vorhandenen Urokinase, wenn man eine ausreichend große Gelmenge verwendet. Mit Vorteil bewirkt man die Bindung mit Hilfe einer Chromatographietechnik, bei der man das Gel in das Innere einer Chromatographiesäule einbringt. Die beiden Urokinasearten der als Ausgangsmaterial eingesetzten Mischung können dann durch eine entsprechende Entwicklung der Chromatographiesäule getrennt werden, insbesondere unter Anwendung eines linearen Gradienten, indem man eine Pufferlösung mit ähnlichem pH-Wert, deren Ammoniumsulfatkonzentration man progressiv bis zu einem Wert, der insbesondere zwischen 0,1 bis 0,5 Mol/l und vorzugsweise bei etwa 0,25 Mol/l liegt, erhöht, durch die Säule führt. Die erhaltenen Eluate können in klassischer Weise in Fraktionen aufgeteilt und Analysen bezüglich ihres Gehalts an Proteinen und bezüglich ihrer Urokinaseaktivität unterworfen werden, bevor man sie in Abhängigkeit von der Art ihres Inhalts vereinigt. Insbesondere kann man jene Gruppen vereinigen, die jeweils den beiden getrennten Banden mit Urokinaseaktivität entsprechen, die man erreicht, wenn man die verschiedenen Elutionsparameter in an sich bekannter Weise steuert.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird mit Vorteil auf eine Urokinase angewandt, die eine spezifische Aktivität von mindestens 5.000 CTA-Einheiten/mg Protein und vorzugsweise von 8.000 CTA-Einheiten/mg Protein oder mehr aufweist.

Im folgenden seien, ohne daß hierdurch eine Einschränkung der Erfindung erfolgen soll, die besonders geeigneten Bedingungen zur Trennung der genannten beiden getrennten Fraktionen angegeben, die ihrerseits den beiden gewünschten Urokinasearten entsprechen.

Man bereitet eine mit dem Ionenaustauschergel (Carboxymethyl-Sepharose [®]) gefüllte Säule in der Weise, daß man pro 0,1 bis 1 Million CTA-Einheiten Urokinase und vorzugsweise pro 0,4 Millionen CTA-Einheiten Urokinase 1 ml des Gels zur Verfügung hat.

Dann äquilibriert man diese Säule mit einem 0,01 bis 0,06m und vorzugsweise mit einem 0,04m Ammoniumsulfatpuffer mit einem pH-Wert zwischen 4,0 und 7,0 und vorzugsweise mit einem pH-Wert von 6,0.

Man löst dann die zu trennende Urokinasemischung in einer Menge von 200.000 CTA-Einheiten pro ml in diesem Puffer und dialysiert das Material während 8 Stunden gegen 100 bis 200 Volumen des gleichen Puffers. Nach einer eventuell durchgeführten Zentrifugation zur Entfernung unlöslicher Anteile, die im Verlaufe dieser Dialyse aufgetreten sein können, trägt man die erhaltene Lösung in einem Durchsatz von 0,1 bis 1 Säulenvolumen/Stunde und vorzugsweise mit einem Durchsatz von 0,5 Säulenvolumen/Stunde auf die Säule auf. Die Säule wird dann mit dem zum Äquilibrieren verwendeten Puffer gespült, bis der Abstrom der Säule keine Proteine mehr enthält.

Die Säule wird anschließend unter Anwendung eines linearen Gradienten entwickelt, den man beispielsweise in klassischer Weise mit Hilfe von zwei Behältern bildet, die ein identisches Volumen der nachstehenden Puffer enthalten:

Behälter 1: 10 bis 30 Säulenvolumen, vorzugsweise 20 Säulenvolumen des für das Äquilibrieren verwendeten Puffers;

Behälter 2: 10 bis 30 Säulenvolumen eines 0,1 bis 0,5m und vorzugsweise eines 0,25m Ammoniumsulfatpuffers mit einem pH-Wert von 4,0 bis 7,0 und vorzugsweise von 6,0.

Diese Behandlung erfolgt vorzugsweise mit einem Durchsatz, der identisch ist mit dem bei der Beschickung und dem Waschen der Säule angewandten Durchsatz.

5 Der Säulenabstrom wird in einer Fraktionssammeleinrichtung aufgefangen, wobei der Proteingehalt dieses Abstroms kontinuierlich mit Hilfe eines aufzeichnenden Spektrophotometers analysiert wird.

10 Typische Kurven, die man durch das Auftragen des Proteingehalts bzw. der Urokinaseaktivität des Abstroms gegen das Elutionsvolumen erhält, sind in der Fig. 1 dargestellt.

15 Die Kurven bezüglich des Proteingehalts und der Urokinaseaktivität zeigen zwei deutliche Maxima. Die Bestimmung des Molekulargewichts der dem ersten Maximum entsprechenden Urokinase zeigt, daß dieses Material als Hauptbestandteil die Urokinase I mit einem Molekulargewicht von 33.000 ± 3.300 enthält. Die dem zweiten Maximum entsprechende Urokinase besitzt ein Molekulargewicht von 54.000 ± 5.400 . So ist es also möglich, diese beiden Urokinasearten vollständig zu trennen, so daß man Zubereitungen erhalten kann, die insbesondere die Urokinase II
20 mit einer Reinheit enthalten, die sich darin widerspiegelt, daß man dann, wenn man diese Zubereitung auf der Grundlage von Urokinase einem Verfahren unterwirft, das darin besteht, daß man sie in einer 0,04m Ammoniumsulfatlösung mit einem pH-Wert von 6 löst, diese Lösung in einer Chromatographie-
25 säule mit einem in ausreichender Menge verwendeten Gel des Typs der Carboxymethyl-Sepharose in Kontakt bringt und die Kolonne unter Anwendung eines linearen Gradienten eluiert, bis man ein Eluat mit einem pH-Wert von 6 erhält, das einen Ammoniumsulfatgehalt von 0,25 Mol/l aufweist, lediglich eine
30 einzige Bande mit Urokinaseaktivität erhält.

Es versteht sich jedoch, daß die Zubereitung auf der Grundlage

5 lediglich der Urokinase II, die praktisch nicht mit Urokinase I "verunreinigt" ist, gegebenenfalls einer ergänzenden Reinigung unterworfen werden kann, um die Fremdproteine möglichst weitgehend zu entfernen und ihre spezifische Urokinaseaktivität zu erhöhen, insbesondere mit dem Ziel, eine Zubereitung auf der Grundlage von Urokinase II zu erhalten, die für eine therapeutische Anwendung ausreichend rein ist. Beispiele für solche Reinigungsmethoden finden sich in den nachstehenden Beispielen.

10 Wie bereits angegeben wurde, zeigen die beiden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren getrennten Urokinasefraktionen Unterschiede hinsichtlich ihrer enzymatischen Wirkung gegenüber verschiedenen Substraten, ob es sich nun um synthetische oder natürliche Substrate oder verschiedene Formen von
15 Plasminogen, insbesondere Methionyl- oder Lysyl-plasminogene einerseits und Glutamyl-plasminogen andererseits handelt. Diese Unterschiede wurden mit Hilfe der nachstehenden drei Bestimmungsmethoden festgestellt:

20 Die Fibrinplättchentechnik nach Ploug und Kjeldgaard (J. Ploug, N.O. Kjeldgaard, Biochim. Biophys. Acta 24 (1957) 278 bis 282);

die Fibringerinnseltechnik der gleichen Autoren (J. Ploug, N.O. Kjeldgaard, Biochim. Biophys. Acta 24 (1957) 278 bis 282); und

25 die Technik des synthetischen Substrats AGLME nach Walton (P.L. Walton, Biochim. Biophys. Acta 132 (1967) 104 bis 114.

Diese Bestimmungsmethoden wurden unter Anwendung des offiziellen CTA-Bewertungssystems des Committee on Thrombolytic Agents, National Heart Institute, USA, durchgeführt.

Es wurden zwei Arten von Plasminogen verwendet. Bei dem ersten Plasminogen handelt es sich um einen Typ der Plasminogene, die normalerweise in dem menschlichen Plasma enthalten sind. Dieses Plasminogen besteht im wesentlichen aus Glutamyl-plasminogen, d. h. einem durch Urokinase zu Plasmin aktivierbaren Plasminogenderivat, dessen endständige Aminosäure mit freier Aminogruppe die Glutaminsäure ist.

Das zweite Plasminogen kann als das Derivat eines Glutamyl-plasminogens angesehen werden, von dem ein Peptid abgespalten worden ist, das den endständigen Glutaminsäurerest aufweist. Die Plasminogene dieses zweiten Typs, die im folgenden der Einfachheit halber als "modifizierte Plasminogene" bezeichnet werden, besitzen ebenso wie Glutamyl-plasminogen die Fähigkeit, unter der Einwirkung eines Aktivators, wie Urokinase, durch Spaltung einer Arginyl-Valin-bindung ihres Moleküls zu Plasmin aktiviert zu werden.

Es ist bekannt, daß man ausgehend von Humanplazenta mit Hilfe des Verfahrens, das insbesondere in dem Artikel von Jean-Claude Lormeau et al "Purification et propriétés des plasminogènes extraits du placenta humain" (Annales Pharmaceutiques Françaises, 34, Nr. 7-8 (1976), 287 bis 296) beschrieben ist, erhebliche Mengen modifizierter Plasminogene gewinnen kann, die insbesondere Methionyl- und Lysyl-plasminogene, d. h. Plasminogene, die als endständige Aminosäuren mit freier Aminogruppe Methionin und Lysin enthalten.

Wie ebenfalls von den genannten Autoren festgestellt werden konnte, bindet sich Glutamyl-plasminogen kaum an Fibrinogengerinnsel. Im Gegensatz dazu können die modifizierten Plasminogene an Fibringerinnseln gebunden werden.

Bezüglich des Verhaltens der erfindungsgemäß gereinigten Urokinasen gegenüber diesen verschiedenen Plasminogentypen wurde

insbesondere die Fibringerinnselbestimmungsmethode nach Ploug (J. Ploug, N.O. Kjeldgaard, Biochim. Biophys. Acta 24 (1957) 278 bis 282) angewandt, welche Methode jedoch in der Weise modifiziert wurde, daß man das zu untersuchende Plasminogen (Lysyl- oder Glutamyl-plasminogen) in einer Menge von 4 mg zu 100 mg Fibrinogen zugibt und die Änderung der Lysezeit eines durch Zugabe von Thrombin zu 1 ml dieses Fibrinogens gebildeten Gerinnsels in Gegenwart von wachsenden Mengen der untersuchten Urokinasen bestimmt.

Die verschiedenen angewandten Bestimmungsmethoden lassen erkennen, daß die Urokinase II eine Aktivität gleicher Größenordnung auf Fibringerinnsel, Fibrinplättchen und das AGLME-Substrat ausübt, während die Urokinase I enthaltende Fraktion eine Wirkung gegen Fibringerinnsel zeigt, die etwa um den Faktor 3 geringer ist als ihre Aktivität gegen Fibrinplättchen und das AGLME-Gerinnsel.

Bezüglich der Verbindungen des Plasminogentyps hat es sich gezeigt, daß die Urokinase I und die Urokinase II die gleiche Wirkung gegenüber Lysyl-plasminogen ausüben, während die Urokinase II gegenüber Glutamyl-plasminogen wesentlich wirksamer ist. In der Tat ist die Urokinase II gegenüber Glutamyl-plasminogen um den Faktor 2,5 wirksamer als die Urokinase I, wobei die Urokinase II gegenüber Glutamyl-plasminogen ebenso wirksam ist wie gegenüber Lysyl-plasminogen.

Es hat sich weiterhin gezeigt, daß die Urokinase II die Plasminogenketten in spezifischer Weise im Bereich der erwähnten Arginyl-Valin-bindung spaltet. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene, Urokinase I enthaltende Fraktion ist weniger spezifisch und verursacht Spaltungen an anderen Stellen des Moleküls. Diese Feststellungen wurden insbesondere dadurch gewonnen, daß man die Urokinasen während variabler Zeitdauern (15 Minuten bis 24 Stunden) mit Plasminogen in

Kontakt bringt und die erhaltenen Produkte einer Elektrophorese auf Polyacrylamidgel unterwirft.

Schließlich konnte festgestellt werden, daß 60.000 CTA-Einheiten Urokinase II eine Aktivität besitzen, die der von 100.000 CTA-Einheiten Urokinase I entsprechend, und zwar bezüglich der Lyse von Gerinnseln, die man zuvor ausgehend von verschiedenen Human-substraten gebildet hat (Gesamtblut, an Blutplättchen reiches oder an Blutplättchen verarmtes Plasma). Diese Ergebnisse wurden anhand von Versuchen gewonnen, die darauf abzielten, durch Thrombo-elastographie die Dosis der beiden Urokinasen zu bestimmen, die dazu genügt, eine vollständige Lyse solcher unter identischen experimentellen Bedingungen vorgebildeter Gerinnsel in einer Zeit zwischen 10 und 15 Minuten zu bewirken.

Aus diesen Feststellungen ergeben sich wichtige Konsequenzen bezüglich der therapeutischen Anwendung der Urokinase II und insbesondere bei thrombolytischen Behandlungen.

In der Tat ist die Anwendung der Urokinase II bei thrombolytischen Behandlungen besonders indiziert aufgrund ihres gleich guten Aktivierungsvermögens gegenüber Glutanyl-plasminogen, d. h. dem natürlich zirkulierenden Plasminogen, und modifizierten Plasminogenen. Hieraus ergibt sich eine bemerkenswerte Steigerung der thrombolytischen Wirkung, die eine Verminderung der Dosierung ermöglicht gegenüber derzeitigen Behandlungen mit Mischungen aus Urokinase I und Urokinase II, und insbesondere mit Mischungen, die als überwiegenden Bestandteil Urokinase I enthalten.

Die Verminderung der notwendigen Urokinasedosis führt nicht nur zu wirtschaftlichen Einsparungen, sondern und insbesondere auch zu einer Verminderung der gut bekannten Nebenwirkungen, die bei der Behandlung mit Urokinase auftreten können.

Aufgrund des breiteren Wirkungsspektrums und der größeren Selektivität der Wirkung der Urokinase II gegenüber Plasminogenen und der daraus verursachten wahrscheinlich geringeren Wirkung auf andere Gerinnungsfaktoren stellt die Urokinase II ein perfektes Arzneimittel mit besonders hohem Wert dar, so daß es selbst für die Behandlung von chirurgischen Operationen unterzogenen Patienten verwendet werden kann, ohne daß das Risiko von Blutungen erhöht wird.

Es ist festzuhalten, daß es bei bestimmten Behandlungen mit Urokinase II von Vorteil sein kann, vor der Verabreichung von Urokinase II ein modifiziertes Plasminogen zu geben. Natürlich rechtfertigt sich diese vorausgehenden Verabreichung von modifiziertem Plasminogen in diesen Fällen nicht nur durch eine schnellere Wirkung der Urokinase, sondern auch durch die Anwesenheit größerer Mengen in situ in den Thromben-aktivierbaren Plasminogens.

Schließlich ist festzuhalten, daß das erfindungsgemäße Verfahren die Gewinnung von gereinigten Urokinasen mit sehr hoher spezifischer Aktivität ermöglicht, insbesondere Zubereitungen auf der Grundlage von Urokinase II, die mindestens 100.000 CTA-Einheiten pro mg Protein enthalten, unabhängig davon, welches Substrat für die Bestimmung verwendet würde.

Gegenstand der Erfindung sind ferner pharmazeutische Zubereitungen oder Arzneimittel, die die in dieser Weise gewonnenen Urokinasefraktionen enthalten.

Die Erfindung sei im folgenden unter Bezugnahme auf die nachstehenden Beispiele näher erläutert.

Die als Ausgangsmaterial verwendete Mischung aus Urokinase I und Urokinase II erhält man ausgehend von Humanurin nach der in der FR-PS 71 34435 beschriebenen Verfahrensweise. Die Mischung enthält 20 Millionen CTA-Einheiten Urokinase und be-

sitzt eine spezifische Aktivität von 40.000 CTA-Einheiten pro mg Protein.

In den folgenden Beispielen erfolgt die Bestimmung der Proteine nach der Methode von Lowry (J. Biol. Chem. 193 (1951), 265) unter Anwendung einer Mischung aus Albumin und Gamma-Globulinen als Vergleichstiter.

Die Molekulargewichte wurden durch Geltitration unter Verwendung des vernetzten Dextrangels, das im Handel unter der Bezeichnung Sephadex G100 erhältlich ist, in einem 0,25m Ammoniumsulfatpuffer mit einem pH-Wert von 5 bestimmt. Die Bestimmungen der Molekulargewichte der verschiedenen Urokinasearten wurden unter Anwendung von Albumin (MG = 67.000), Ovalbumin (MG = 45.000), Chymotrypsinogen (MG = 25.000) und Myoglobin (MG = 17.800) als Vergleichssubstanzen ermittelt.

Die Bestimmung der Urokinaseaktivität erfolgte unter Anwendung der weiter oben beschriebenen Methoden.

Sämtliche beschriebenen Trennungsmaßnahmen wurden bei +4°C durchgeführt.

Die beigelegten Zeichnungen dienen ebenfalls der Erläuterung der Erfindung. In den Zeichnungen zeigen die Fig. 1 und 2 repräsentative Kurven, die durch Auftragen der Proteingehalte (ausgedrückt als bei 280 nm bestimmte optische Dichte (D.O. 280 nm)) bzw. der Urokinaseaktivität (die an Fibrinplättchen bestimmt und als Lyseoberfläche in mm² (Auk, mm²)) der verschiedenen Fraktionen auf der Ordinatenachse gegen die Anzahl (N) der nacheinander eluierten Fraktionen (auf der Abszisse) erhalten wurden.

- 18 -
17

Beispiel 1

5 Man äquilibriert eine Säule mit einem Durchmesser von 2,6 cm und einer Höhe von 10 cm, die 50 ml Carboxymethyl-Sepharose enthält, mit einem 0,04m Ammoniumsulfatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 (verwendetes Puffervolumen: 400 ml).

Man löst dann die genannte Urokinasemischung in 100 ml des für das Äquilibrieren verwendeten Puffers und dialysiert die erhaltene Lösung während 8 Stunden gegen 15 l des gleichen Puffers.

10 Die 180 ml des erhaltenen Dialysats zentrifugiert man während 10 Minuten bei 10.000 g, um das während der Dialyse in geringer Menge aufgetretene unlösliche Material zu entfernen.

15 Die erhaltene klare Lösung wird dann mit einem Durchsatz von 25 ml/Stunde durch die Säule geführt. Die Säule wird anschließend mit dem für das Äquilibrieren verwendeten Puffer gewaschen, bis in dem Abstrom keine Proteine mehr auftreten (verwendetes Puffervolumen: 320 ml). Anschließend entwickelt man die Säule mit Hilfe eines linearen Gradienten, den man unter Anwendung von 2 Behältern bildet, von denen der erste 20 1 l 0,04m Ammoniumsulfatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 und der zweite 1 l 0,25m Ammoniumsulfatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 enthalten. Der Säulenabstrom wird in 20 ml-Röhrchen einer Fraktionssammeleinrichtung aufgefangen, wobei der Proteingehalt der aufgefangenen Fraktionen kontinuierlich analysiert wird.

30 Die in der Fig. 1 dargestellten Kurven A bzw. B repräsentieren die Änderungen des Proteingehalts bzw. der Urokinaseaktivität der nacheinander eluierten 40 Fraktionen. Die Zahl der aufeinanderfolgend eluierten Fraktionen sind auf der Abszisse der graphischen Darstellung der Fig. 1 aufgetragen.

- 18

Die Röhren Nr. 8 bis 18 der Fraktionssammeleinrichtung werden vereinigt und bilden die Fraktion UK I. Die Röhren der Nummern 24 bis 37 bilden die Fraktion UK II, während die Röhren der Nummern 19 bis 23 die Fraktion UK III bilden.

- 5 Die Fraktion UK III, die eine Mischung aus den Fraktionen UK I und UK II darstellt, wird verworfen. Die Analysenwerte der Fraktionen UK I und UK II sind in der nachstehenden Tabelle I zusammengestellt.

TABELLE I

| | UK I | UK II |
|--|-----------------------|----------------------|
| Volumen | 220 ml | 280 ml |
| Proteingehalt | 160 mg | 375 mg |
| Aktivität gegenüber dem AGLME-Substrat | 1,5 Mio CTA-Einheiten | 16 Mio CTA-Einheiten |
| Aktivität gegen Fibrinplättchen | 1,5 Mio CTA-Einheiten | 19 Mio CTA-Einheiten |
| Aktivität gegen Fibringerinnsel | 0,5 Mio CTA-Einheiten | 19 Mio CTA-Einheiten |
| Molekulargewicht der in der Fraktion enthaltenen Urokinase | 33.000 | 54.000 |
| Aktivität (gegenüber dem AGLME-Substrat), die dazu erforderlich ist, im Verlaufe von 1 St. ein ausgehend von 1 ml Plasma gebildetes Gerinnsel zu lösen | 200 CTA-Einheiten | 80 CTA-Einheiten |

10 Beispiel 2

Man äquilibriert eine mit Carboxymethyl-Sepharose (CM-Sepharose CL 6 B) beschickte Säule (26 mm x 100 mm) mit einem 0,04m Ammoniumsulfatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0. Dann trägt man die Urokinase mit einem Durchsatz von 30 ml/Stunde auf

5 die Säule auf. Anschließend spült man die Säule mit dem 0,04m Puffer mit einem pH-Wert von 6,0, bis der Abstrom keine Proteine mehr enthält. Dann entwickelt man die Säule unter Anwendung eines linearen Gradienten, den man unter Verwendung von zwei Behältern bildet, von denen der erste 1 l des 0,04m Ammoniumsulfatpuffers mit einem pH-Wert von 6,0 und der zweite 1 l eines 0,25m Ammoniumsulfatpuffers mit einem pH-Wert von 6,0 enthalten. Der Säulenabstrom wird in Fraktionen von jeweils 18 ml aufgefangen.

10 Die in der Fig. 2 dargestellten Kurven A und B verdeutlichen ebenso wie in dem Beispiel 1 die Proteinkonzentration (Kurve A) bzw. die Urokinaseaktivität (Kurve B) der verschiedenen Fraktionen, deren Zahl auf der Abszissenachse aufgetragen ist.

15 Die in der Fig. 2 angegebene Gerade C repräsentiert den Ammoniumsulfatgradienten, der als " $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Molarität" angegeben ist.

Wie in Beispiel 1 lassen die in der Fig. 2 dargestellten Kurven erkennen, daß die Urokinaseaktivität in zwei getrennten Fraktionen auftritt.

20 Die Röhrchen 13 bis 22 werden vereinigt unter Bildung der Fraktion I, während die Röhrchen 30 bis 48 zu der Fraktion II vereinigt werden. Die Röhrchen 23 bis 29, die 20 % der auf die Säule aufgetragenen Aktivität entsprechen, werden verworfen, wenngleich sie eine Mischung aus den Fraktionen I und II enthalten.

25

Die Fraktionen I und II werden durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat (500 g/l) bei einem pH-Wert von 5 und Wiederauflösen des Niederschlags in der minimalen Menge destillierten Wassers eingeeengt.

Die Analysenwerte der erhaltenen Fraktionen I und II sind in der nachstehenden Tabelle II zusammengestellt.

TABELLE II

| | Fraktion I | Fraktion II |
|--|------------------------|------------------------|
| Volumen | 198 ml | 472 ml |
| Aktivität gegenüber dem AGLME | 9830 CTA-Einheiten/ml | 25400 CTA-Einheiten/ml |
| Aktivität gegenüber Fibrinplättchen | 11870 CTA-Einheiten/ml | 42500 CTA-Einheiten/ml |
| Aktivität gegenüber Fibringerinnsel | 3050 CTA-Einheiten/ml | 31660 CTA-Einheiten/ml |
| Proteingehalt | 0,90 mg/ml | 0,6 mg/ml |
| Prozentsatz der auf die Säule abgeschiedenen Aktivität | 11 % | 60 % |

5 Um eine Untersuchung des enzymatischen Verhaltens der in den Fraktionen I und II enthaltenen Urokinasen zu ermöglichen, wurden diese ergänzenden Reinigungen unterzogen, die für die beiden Fraktionen unter identischen Bedingungen erfolgten.

10 Eine erste Reinigungsmethode besteht in einer Filtration über dem unter der Bezeichnung Ultrogel ACA 4/4 bekannten Gel, wobei man jede dieser Fraktionen in einem 0,25m Ammoniumsulfatpuffer mit einem pH-Wert von 5,0 löst. Die Filtration erfolgt unter Verwendung einer Säule (5 cm x 1 m), deren Abstrom in Fraktionen von 7 ml aufgefangen wird. Wie im vorhergehenden Fall vereinigt man jene eluierten Fraktionen, die die Urokinaseaktivität enthalten. Die vereinigten Fraktionen werden in der nachstehenden Tabelle III als "Fraktion I_A" bzw. "Fraktion II_A" bezeichnet.

TABELLE III

| | Fraktion I _A | Fraktion II _A |
|---|-------------------------|--------------------------|
| Volumen | 123 ml | 100 ml |
| Aktivität gegenüber dem AGLME | 6830 CTA-Einheiten/ml | 33570 CTA-Einheiten/ml |
| Aktivität gegenüber Fibrinogenplättchen | 6510 CTA-Einheiten/ml | 35100 CTA-Einheiten/ml |
| Aktivität gegenüber Fibringerinnsel | 1970 CTA-Einheiten/ml | 43950 CTA-Einheiten/ml |
| Proteingehalt | 0,06 mg/ml | 0,35 mg/ml |

5 Eine noch stärkere Reinigung erreicht man wie folgt durch Affinitätschromatographie. Man verwendet als Affinitätsmatrix ein makromolekulares Material auf der Grundlage von Agarose, das Gruppen eines Urokinase inhibierenden Materials, nämlich p-Aminobenzamidin, enthält, die über kovalente Bindungen an das makromolekulare Material über gerade Ketten aus Lysylsuccinylgruppen gebunden sind. Dann äquilibriert man eine
 10 mit der Affinitätsmatrix beschickte Säule (10 mm x 70 mm) mit einem 0,05m Tris-HCl-puffer mit einem pH-Wert von 7,5 und 0,5m NaCl. Die zu reinigende Urokinase wird in diesem Puffer gelöst und dann auf die Säule aufgetragen. Man spült die Säule mit dem gleichen Puffer und dann mit dem 0,5m Tris-HCl-puffer; 1m NaCl, bis der Abstrom keine Proteine mehr enthält.
 15 Die Urokinase wird dann mit einem 0,3m Glycin-HCl-puffer mit einem pH-Wert von 3,5 eluiert und als Eluat aufbewahrt, das auch gefriergetrocknet werden kann.

20 Die Analysenwerte der erhaltenen Fraktionen I_B und II_B sind in der nachstehenden Tabelle IV zusammengestellt.

TABELLE IV

| | Fraktion I _B | Fraktion II _B |
|---|-------------------------|--------------------------|
| Aktivität gegen AGLME-Substrat (CTA-Einheiten/mg Proteine) | 165.000 | 104.000 |
| Aktivität gegen Fibrinplättchen (CTA-Einheiten/mg Proteine) | 170.000 | 128.000 |
| Aktivität gegen Fibringerinnsel (CTA-Einheiten/mg Protein) | 54.000 | 126.000 |

Die nachstehende Tabelle V enthält die Ergebnisse der Bestimmung der Urokinaseaktivität der Fraktionen I_B und II_B bezüglich zwei Arten von Plasminogen. Die Bestimmungen wurden unter Anwendung der modifizierten Bestimmungsmethode von Ploug durchgeführt.

TABELLE V

Vergleich der Aktivitäten der Fraktionen I_B und II_B gegen Glutamyl- und Lysyl-plasminogen.

| Art des Plasminogens | Fraktion I _B | | | Fraktion II _B | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------|-----|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | Glutamyl-plasminogen | | | Lysyl-plasminogen | | | | |
| CTA-Einheiten (an AGLME bestimmt) | 3 | 4,5 | 6 | 7,5 | 3 | 4,5 | 6 | 7,5 |
| Lysezeit (in Minuten und Sekunden) | 16' | 12' | 11' | 9' | 9' | 7' | 6' | 6' |
| | 35" | 55" | 05" | 30" | 30" | 55" | 40" | 10" |

809842/1006

Aus der obigen Tabelle ist zu ersehen, daß die Aktivität der Urokinase II gegenüber Glutamyl-plasminogen und gegenüber Lysyl-plasminogen praktisch die gleiche ist. Es ist ferner festzuhalten, daß bei gleicher Dosierung die Urokinase I und die Urokinase II äquivalente Wirkungen gegenüber Lysyl-plasminogen ausüben. Schließlich ist festzuhalten, daß drei CTA-Einheiten der Urokinase II gegenüber Glutamyl-plasminogen eine Wirkung gleicher Größenordnung ausüben, wie 7,5 CTA-Einheiten Urokinase I.

- 10 Gegenstand der Erfindung sind daher auch pharmazeutische Zubereitungen oder Arzneimittel auf der Grundlage von Urokinase II, die frei sind von Urokinase I und die die Urokinasen in Kombination mit ihre Verabreichung ermöglichenden Trägermaterialien, Bindemitteln und/oder Hilfsstoffen enthalten.
- 15 Vorzugsweise liegen sie in Form von sterilen isotonischen Lösungen vor, die durch Injektion, Perfusion oder über Katheter in der unmittelbaren Nähe des oder der aufzulösenden Thromben verabreicht werden können.

- 20 Beispielsweise kann man zur Behandlung von Lungenembolien die für die thrombolytische Behandlung erforderliche Menge Urokinase oder den "Bolus" entweder durch eine langsame Allgemeinperfusion oder durch eine direkte lokale Verabreichung in das Lungenarteriensystem mit Hilfe eines Katheters, insbesondere eines Angiopneumographiekatheters, bewirken.

- 25 Die Urokinase II kann unter Anwendung der folgenden Dosierungen verabreicht werden:

Langsame Verabreichung durch Perfusion: durchschnittlich stündlich 75.000 bis 120.000 im Mittelwert 112.000 CTA-Einheiten Urokinase während 24 Stunden;

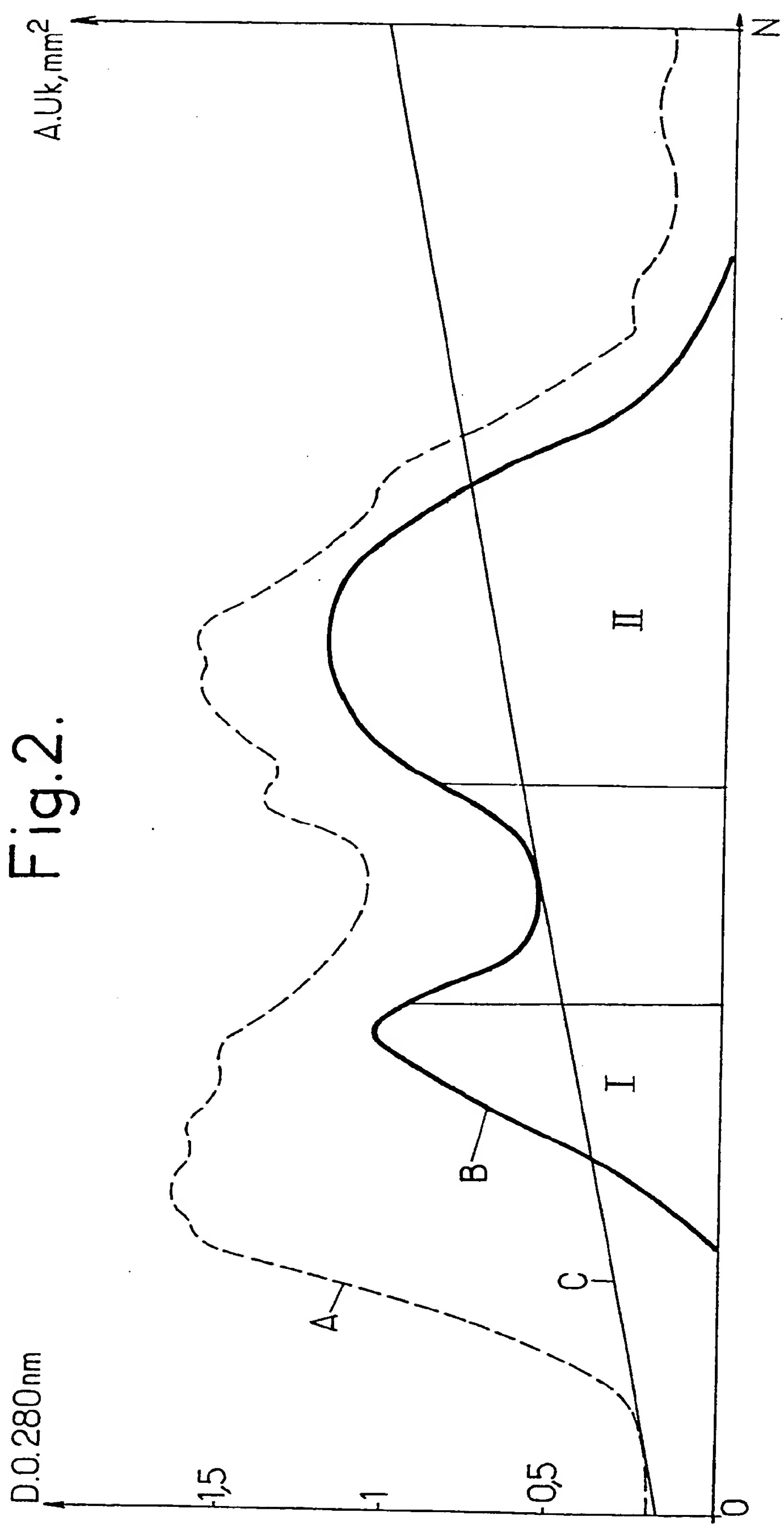
- 30 in situ-Verabreichung eines Bolus im Kontakt mit dem Throm-

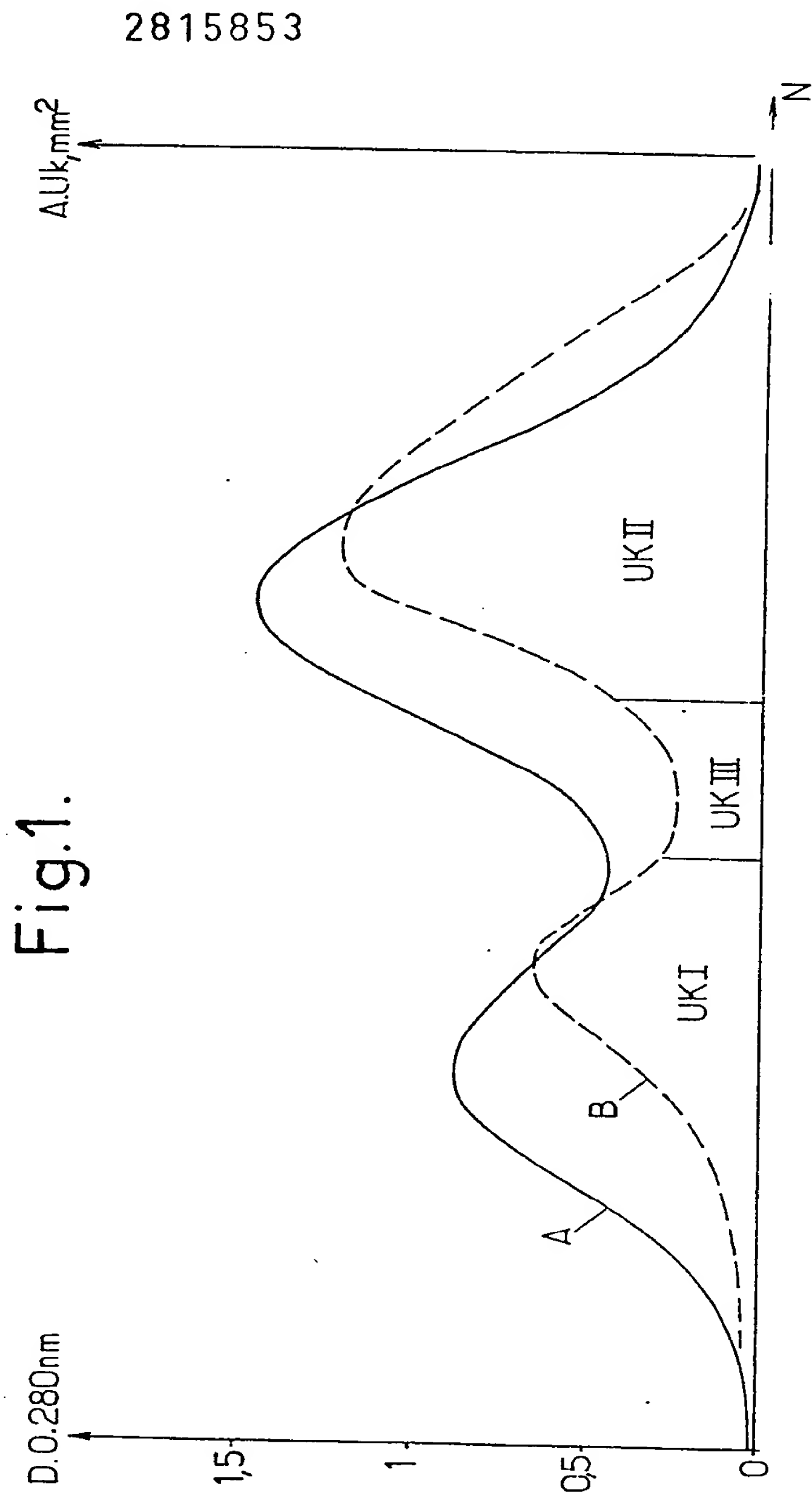
2815853

~~24~~
25

bus mit Hilfe eines Katheters: insbesondere 800.000 bis
1.000.000 CTA-Einheiten, die im Verlaufe von einigen 10
Minuten gegeben werden.

809842 / 1006





809842/1006